

Zur Frage der Beeinflussung des
Hefezellstoffwechsels
durch blutzuckersenkende Substanzen

von

THEODOR HANS SCHMIDT

Aus der I. Medizinischen Klinik
des städtischen Krankenhauses Nürnberg
Vorstand:Medizinaldirektor Prof.Dr.med.habil.D.Jahn



Zur Frage der Beeinflussung des Hefezellstoffwechsels
durch blutzuckersenkende Substanzen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen

Vorgelegt von
Theodor Hans Schmidt
aus Nürnberg.

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Erlangen

Dekan: Prof. Dr. med. F. H e i m

1. Referent: Prof. Dr. med. D. J a h n
2. Referent: Prof. Dr. med. F. H e i m

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 1959.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung.....	1
Einleitung.....	2
I. Untersuchungen über Atmung und Gärung von Hefezellsuspensionen.	
1. Methodik.....	6
2. Ergebnisse.	
a) Leeratmung von Hefezellsuspensionen....	10
b) Atmung und Gärung in Gegenwart blutzuckersenkender Substanzen.....	12
II. Verhalten des Phosphatstoffwechsels von Hefezellsuspensionen.	
1. Einleitung.....	20
2. Methodik.....	21
3. Ergebnisse.	
a) Verhalten des anorganischen Phosphats von Hefezellsuspensionen während der Atmung und Gärung.....	23
b) Verhalten des anorganischen Phosphats während der Atmung und Gärung in Ge- genwart blutzuckersenkender Substan- zen.....	25
III. Diskussion.....	27
IV. Literaturverzeichnis.....	30
Lebenslauf.....	32



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Zusammenfassung:

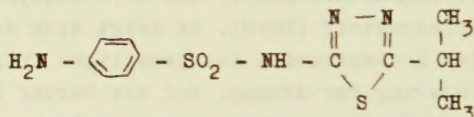
Die Arbeit untersucht das Verhalten von Atmung, Gärung und Phosphorylierung von Hefezellsuspensionen in Gegenwart blutzuckersenkender Substanzen, insbesondere von N-Sulfanilyl-N-Butylharnstoff (BZ55) und N-(4-Methylbenzolsulfonyl)-N-Butylharnstoff (D860). Es zeigt sich dabei eine deutliche von der Konzentration des jeweiligen Präparates abhängige Verminderung der Atmung. Auf die Gärung dagegen kann kein sicherer Einfluss nachgewiesen werden.

Im selben Sinne sind die Untersuchungen über das Phosphorylierungsvermögen zu deuten: bei der Atmung geht der Verbrauch an anorganischem Phosphat durch die blutzuckersenkenden Substanzen deutlich gegenüber der Norm zurück. Bei den Gärversuchen beeinflusst BZ55 und D860 kaum die Phosphorylierungsvorgänge.

In der Diskussion werden diese Befunde als Schädigung von Fermentaktivitäten des Zitronensäurezyklusses gedeutet, wobei vor allem an eine Insuffizienz des CoA Enzyms gedacht wird.

ZUR FRAGE DER BEEINFLUSSUNG DES HEFEZELLSTOFFWECHSELS DURCH BLUTZUCKERSENKENDE SUBSTANZEN.

1942 beobachteten Janbon und Mitarbeiter bei der klinischen Prüfung von Paraaminobenzolsulfonamidisopropylthiodiazol (IPTD)



zum ersten Mal, dass ein Sulfonamid den Blutzucker in Abhängigkeit des Blutsulfonamidspiegels senkt (1,2).

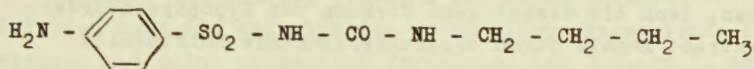
Loubatières, La Barre und Rüsse suchten in zahlreichen Versuchen das Wirkungsprinzip aufzuklären (3,4). Da sie weder beim pankreatektomierten, noch beim alloxandiabetischen Tier deutliche Blutzuckersenkungen beobachten konnten, sondern die Gegenwart mindestens eines Restes funktionstüchtigen Pankreasgewebes Voraussetzung für den blutzuckersenkenden Effekt des IPTD war, schlossen sie, dass die Insulinsekretion stimuliert wird (5).

Der Arbeitskreis um von Holt konnte eine weitgehende, bis zur Entinselung gehende A-Zellenschädigung am Kaninchenpankreas durch IPTD nachweisen (6,7), was jedoch nicht von Creutzfeld und Tecklenborg bestätigt werden konnte (8,9).

IPTD fand, wohl wegen der dramatischen Zwischenfälle bei Janbon, nicht Eingang in die Therapie des Diabetes mellitus. Auch dürften die zur Erreichung einer genügenden Blutzuckersenkung nötigen, relativ hohen Dosen gegen die längere Anwendung gesprochen haben.

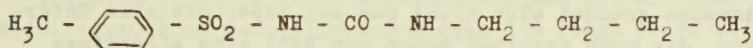
Erst 1955 wurde mit der Synthese und der klinischen Erprobung des N-Sulfanilyl-N-Butylharnstoffs (BZ55) ein blutzuckersenkendes Präparat gefunden, das den Anforderungen einer

oralen Behandlung, wenigstens gewisser Diabetesformen, schon eher entspricht (10,11,12).



Es stellte sich bald heraus, dass der aliphatische Rest innerhalb gewisser Grenzen ohne Verlust der blutzuckersenkenden Eigenschaft variiert werden kann.

1956 wurde ein neues Antidiabetikum entwickelt, das sich grundsätzlich durch das Fehlen der paraständigen Aminogruppe von BZ55 und IPTD unterscheidet; stattdessen findet sich eine Methylgruppe. Dadurch verliert die Verbindung die typischen bakteriostatischen Eigenschaften der Sulfonamide, nicht aber die blutzuckersenkende Wirkung. Es handelt sich um N-(4-Methylbenzolsulfonyl-)N-Butylharnstoff (D860).



Mit der Auffindung dieser Substanz wird der bisher vermutete Zusammenhang zwischen der bakteriostatischen Wirkung einerseits und dem blutzuckersenkenden Effekt andererseits unwahrscheinlich, denn D860 ist infolge der 4-Methylsubstitution am Benzolkern kein Sulfonamid mehr, sondern ein Abkömmling der Toluolreihe. Solche Vermutungen stützen sich vorallem auf Untersuchungen, die sich mit der chemischen Struktur des IPTD und der Senkung des Blutzuckers befassten. Sie hatten ergeben, dass die blutzuckersenkende Wirkung eng an das Paraaminobenzolsulfonamidthiazolgrundgerüst gebunden ist. Vorallem hatte sich die paraständige Aminogruppe am Benzolkern als unentbehrlich erwiesen. Die aliphatische Seitenkette am Thiazol konnte dagegen in gewissem Umfang variiert werden (13).

Die vergleichbaren pharmakologischen und klinischen Wirkungen von IPTD, BZ55 und D860 sowie die strukturelle Ähnlichkeit lassen jedoch auf ein gleiches Wirkungsprinzip schliessen.

Über den Wirkungsmechanismus der blutzuckersenkenden Substanzen selbst lässt sich auf Grund der bisher vorgelegten klinischen und experimentellen Untersuchungen noch nichts

Sicheres aussagen.

Die Hypophyse und das Nebennierenrindensystem scheinen als Angriffsort der antidiabetischen Präparate nicht in Frage zu kommen, denn die diabetogene Wirkung von Hypophysenvorderlappenextrakt konnte durch blutzuckersenkende Sulfonamide nicht beeinflusst werden. Auch wurde bei einer Patientin mit totaler Hypophyseninsuffizienz bei Hypophysentumor ein besonders hoher Sulfonamidspiegel erzeugt und eine sehr starke Hypoglykämie hervorgerufen, was nicht möglich wäre, wenn die Wirkung der Präparate auf einer Hemmung der Drüse beruhte (14). Ebenso wenig veränderte sich bei erfolgreich mit D860 eingestellten Diabetikern die 17-Ketosteroidausscheidung (15).

Sehr lebhaft wird eine unmittelbare Beeinflussung des Inselapparates durch blutzuckersenkende Substanzen diskutiert. Unter anderen vermuten vor allem Ferner und Runge eine Schädigung der glukagonproduzierenden A-Zellen des Pankreas und ein funktionelles Überwiegen der insulinbildenden B-Zellen (16). Diese Annahme gründet sich nicht nur auf experimentelle Untersuchungen, die nach massiven Gaben von BZ55 eine allerdings nur beim Tier histologisch nachweisbare Schädigung und Zerstörung von A-Zellen ergaben, sondern auch auf die Vorstellung, dass in der Pathogenese des Diabetes mellitus dem Insulin-Glukagonantagonismus zentrale Bedeutung zukommt (17).

Kracht und Rausch-Stoomann dagegen beobachteten unter BZ55 regelmässig eine Entgranulierung und Kernschwellung der B-Zellen des Rattenpankreas und deuteten den blutzuckersenkenden Effekt als Folge der Insulinmehrsekretion (18).

Creutzfeld und Finter erhoben ähnliche Befunde unter D860 beim Kaninchenpankreas (19).

Achelis äusserte die Ansicht, dass die Insulinwirkung in der Körperperipherie potenziert werde (20).

Maske kommt auf Grund von histochemischen Zinkuntersuchungen an den Langerhansschen Inseln zu dem Schluss, dass der Angriffspunkt der blutzuckeraktiven Substanzen ausserhalb des Pankreas liegen müsse (21).

Mirsky konnte eine Hemmung der von ihm dargestellten Insulinase durch BZ55 in vivo und in vitro beobachten. Auch klinische Fälle von relativer Insulinresistenz, deren

Insulinbedarf unter BZ55 wesentlich gesenkt werden konnte, lassen sich in dieser Weise interpretieren (22).

Behringer und Lindner vermuten auf Grund entsprechender Befunde, dass die Hypoglykämie durch blutzuckersenkende Substanzen mit einer vermehrten Verwertung des Zuckers in der Leber in Zusammenhang steht. Durch eine vermehrte Glykogenbildung in der Leber kommt es sekundär zum Absinken des Blutzuckerspiegels und damit zu einer Entlastung des Inselapparates. Die Entlastung jedoch erlaubt wieder eine Rationalisierung der peripheren Insulinwirkung.

Wie nicht anders zu erwarten, ist eine eindeutige und exakte Beweisführung bei der Klärung der Wirkungsweise der blutzuckersenkenden Substanzen infolge der ausserordentlich komplexen Stoffwechselverhältnisse des tierischen und des menschlichen Organismus und infolge der vielfältigen blutzuckerregulierenden Mechanismen äusserst schwierig.

Die hier vorgelegten Untersuchungsreihen prüfen daher im Modellversuch an Hefezellsuspensionen die Frage einer direkten, vom hormonalen System komplizierter Organismen unabhängigen Beeinflussung des KH-Stoffwechsels durch blutzuckersenkende Substanzen. Möglicherweise liefern die Untersuchungen über Einfluss von Atmung, Gärung und Phosphorylierung der ganz auf den KH-Abbau eingestellten Hefezelle neue Gesichtspunkte für die Wirkungsweise blutzuckersenkender Verbindungen.

Es ist zu hoffen, dass die Aufklärung des Wirkungsprinzips auch Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der verschiedenen Diabetesformen beim Menschen erlauben wird, die mit diesen Substanzen auf lange Sicht wirkungsvoll zu beeinflussen bzw. nicht zu beeinflussen sind.

I. Untersuchungen über Atmung und Gärung

1. Methodik.

Alle Versuche werden mit Bäckerpresshefe (Bast AG.-Nbg.) durchgeführt.

Der O_2 -Verbrauch bzw. die Kohlensäureentwicklung werden manometrisch in der Warburg-Apparatur (Braun-Melsungen Modell "V") mit Doppelkapillaranometern und den üblichen Reaktionsgefäßen nach der direkten Methode von Warburg gemessen.

Zur Messung des O_2 -Verbrauches der Hefezellsuspension im Reaktionsgefäß wird bei der direkten Warburgmethode das bei der Atmung entstehende CO_2 durch Kalilauge absorbiert. Der Ausschlag des an das Reaktionsgefäß angeschlossene Manometers entspricht dann unter Berücksichtigung der für die herrschenden Versuchsbedingungen und der für jedes Manometer mit zugehörigem Reaktionsgefäß ermittelten Konstanten, dem O_2 -Verbrauch.

Es gilt die Formel: (23)

$$X_{O_2} = h \times K_{O_2}$$

wobei h = abgelesener Manometerausschlag
 K_{O_2} = Gefäßkonstante für O_2
 X_{O_2} = O_2 -Verbrauch in mm

Die Gefäßkonstanten ergeben sich aus der Formel:

$$K = \frac{V_g + \frac{273}{T} \times V_f \times a}{P_0}$$

dabei gilt:

V_g = Volumen des Gasraumes im Reaktionsgefäß
 V_f = Volumen der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß
 a = Absorptionskoeffizient des gemessenen Gases
 T = Versuchstemperatur in $^{\circ}$ abs.
 P_0 = Normaldruck ausgedrückt in mm der verwendeten Manometerflüssigkeit.

Bei den Gärversuchen wird die Kohlensäureentwicklung gemessen. An die Stelle der Kalilauge tritt daher ein neutrales Medium. Die produzierte Kohlensäure errechnet sich dann aus der Formel:

$$X_{\text{CO}_2} = h \times K_{\text{CO}_2}$$

wobei h = abgelesener Manometerausschlag
 K_{CO_2} = Gefäßkonstante für CO_2
 X_{CO_2} = CO_2 -Menge in cmm

Ungenauigkeiten in der Messung, die durch die Retention von Kohlensäure in der Pufferlösung bedingt sind, werden dadurch umgangen, dass bei Versuchsende die CO_2 durch HCl wieder ausgetrieben wird.

Die während der Versuche durch geringe Änderungen der Temperatur des Wasserbades und durch Änderungen des äusseren Luftdruckes hervorgerufenen Manometerschwankungen werden durch ein Thermobarometer, das bei jedem Versuchsansatz mitgeführt wird, registriert und bei der Berechnung berücksichtigt.

Herstellung und Zusammensetzung der Versuchslösungen.

lgr. frischer Bäckerhefe wird in 10 ccm einer Pufferlösung mit der aus Tabelle 1 hervorgehender Zusammensetzung gebracht und mit dem Allglashomogenisator nach Potter und Elvehjem bei einer Drehzahl von 2000 U/Min. ca. 5 Min. homogenisiert. Die so gewonnene Hefezellsuspension wird dann auf 100 ccm Pufferlösung aufgefüllt.

Tab. 1

Sörensen-Phosphat-Puffer ph 7,4

Lösung A: 1/15 m KH_2PO_4

Lösung B: 1/15 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

808 ml Lösung B + 192 ml Lösung A.

Zur Untersuchung kommen die Natriumsalze von N-Butylsulfanilylharnstoff (BZ55), N-Propylsulfanilylharnstoff, Phthalylsulfanilylharnstoff und N-(Methyltenczolsulfonyl-) N-Butylharnstoff (D860).

Das Reaktionsgemisch wird jeweils auf ein pH von 7,4 eingestellt.

Bei Versuchsbeginn wird die Hefezellsuspension mit Glucoselösung versetzt. Sie ist so eingestellt, dass die Endkonzentration im Reaktionskölbchen 4% beträgt.

Füllung der Warburg-Reaktionsgefäße.

Verwendet werden die handelsüblichen mit zentralem Gefäß und Seitenarm versehenen Reaktionskölbchen.

Sie werden wie folgt beschickt:

Hauptraum:	0,3 ml	Hefezellsuspension.
	2,2 ml	gelöste blutzuckersenkende Substanz. Bei Leerversuchen Pufferlösung.
Seitenarm:	0,5 ml	in Puffer gelöste Glucose.
Zentrales Gefäß am Boden des Reaktionskölbchens:	0,4 ml	20 %ige Kalilauge. (Zur Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche werden Filterpapierröllchen (18 x 40) mm eingebracht).

Bei den anaeroben Stoffwechselversuchen wird die Glucose mit in den Hauptraum pipettiert und 0,4 ml n-HCl in das Seitengefäß gegeben um damit bei Versuchsende die retinierte CO_2 aus dem Reaktionsgemisch auszutreiben. Die Kalilauge entfällt dann.

Das Gesamtflüssigkeitsvolumen im Warburgkölbchen beträgt 3,4 ml. Der darübergelegene Gasraum enthält bei den aeroben Versuchen atmosphärische Luft; bei den Gärversuchen reinen Stickstoff, der vor jedem Versuch ca. 15 Min. lang durch das Reaktionsgefäß geblasen wird.

Beschickung des Thermostaten und Versuchsverlauf.

Die Reaktionsgefäße werden an die Manometer angeschlossen und in das Wasserbad des Warburgthermostaten gebracht. Nach

15 Minuten Temperatúrausgleich beginnt der Versuch mit dem Verschliessen der Reaktionskölbchen und dem Einkippen der Glukose in die Hefezellsuspension.

Während des Versuches wird das Reaktionskölbchen mit einer Frequenz von 120/Min. und einer Amplitude von 2,5 cm geschüttelt.

Die Versuchstemperatur beträgt 37° C.

Die Manometer werden alle 10 Min. abgelesen. Letzte Ablesung 60 Min. nach Versuchsbeginn.

Auswertung der Ergebnisse.

Mit den Formeln 1 und 2 wird nach dem abgelesenen Manometerstand der O_2 -Verbrauch bzw. die CO_2 -Produktion pro Kölbchen errechnet und jeweils auf 1 mg getrocknete Hefe bezogen.

Alle Tabellen- bzw. Kurvenwerte stellen den Mittelwert von jeweils 4 Parallelversuchen dar, die infolge guter Übereinstimmung als ausreichend erachtet wurden. Nur die Leerversuchswerte werden aus je 16 Einzelversuchen ermittelt. Mit statistischen Methoden wird ihr normaler Streubereich festgelegt.

Auf eine statistische Auswertung der mit den blutzuckersenkenden Substanzen durchgeführten Versuche konnte bei jeweils nur 4 Parallelversuchen verzichtet werden.

2. ERGEBNISSE.

A. Leeratmung der Hefezellsuspensionen.

Der O_2 -Normverbrauch und seine Schwankungen.

Die Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte, ihre Streuungen und die mittleren Fehler der Mittelwerte von 16 Leerversuchen. Gemessen wird alle 10 Min. Letzte Messung 60 Min. nach Versuchsbeginn.

Tab. 2

t min.	Mittl. O_2 -Verbr. in cmm/mg Hefe	Mittl. Streuung von 16 Versuchen	Mittl. Fehler der Mittelwerte
10	4,42	$\pm 0,76$	0,38
20	12,38	$\pm 2,06$	1,03
30	21,36	$\pm 2,83$	1,42
40	29,72	$\pm 3,56$	1,78
50	37,82	$\pm 4,50$	2,25
60	45,54	$\pm 3,59$	1,79

Die CO_2 -Entwicklung in einer N_2 -Atmosphäre und ihre Schwankungen.

Aus Tabelle 3 sind die mittleren CO_2 -Werte bei der Gärung und ihre statistische Auswertung bei ebenfalls 16 Einzelversuchen ersichtlich.

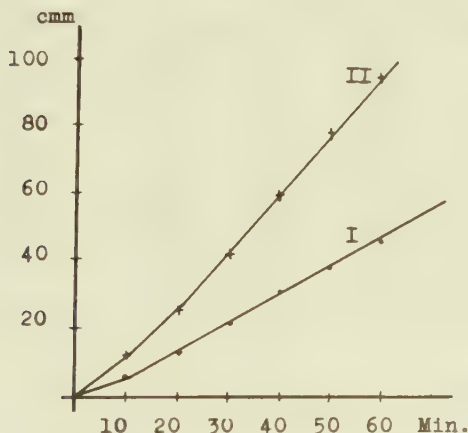
Tab. 3

t min.	Mittl. CO_2 -Prod. in cmm/mg Hefe	Mittl. Streuung von 16 Versuchen	Mittl. Fehler der Mittelwerte
10	12,75	$\pm 1,47$	0,73
20	25,42	$\pm 2,59$	1,29
30	42,42	$\pm 1,31$	0,65
40	59,57	$\pm 2,97$	1,48
50	78,75	$\pm 5,72$	2,86
60	94,32	$\pm 5,35$	2,67

Die Versuchsstreuung hält sich, wie aus den Tabellen hervorgeht, sowohl bei den aeroben als auch bei den anaeroben Untersuchungen, vor allem während der ersten 40 Min., innerhalb enger Grenzen.

Abbildung 1 zeigt die entsprechenden Kurven für die O_2 -Aufnahme (I) im aeroben Versuch und der CO_2 -Entwicklung (II) während des Gärversuchs.

Abb. 1



Die Kurven zeigen, dass nach Zusatz von Glukose zur Hefezellsuspension eine gewisse Startzeit verstreicht ehe Atmung und Gärung voll in Gang kommen. Bei einer Versuchsdauer von 60 Min. zeigen sich noch keine Kurvenmaxima; es haben sich also noch keine Stoffwechselgleichgewichte eingestellt, wie es bei wesentlich längeren Versuchszeiten (24 Std.) beobachtet wurde. Es erweist sich jedoch als hinreichend, Atmung und Gärung in der aktivsten Stoffwechselphase, d.h. während des steilen Kurvenverlaufes zu registrieren.

B. Atmung und Gärung in Gegenwart von
blutzuckersenkenden Substanzen.

Tabelle 4 und Abbildung 2 zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen von BZ55 auf die Hefezellatmung.

Tab. 4

t _{Min.}	Sauerstoffverbrauch in cmm/mg Hefe bei Konzentrationen des BZ55 von:			
	0%	2%	5%	10%
	(Leerversuch)			
10	4,0	2,5	2,0	2,0
20	10,5	7,0	4,6	4,6
30	18,4	13,6	11,2	8,5
40	26,0	20,2	17,0	13,0
50	33,6	27,5	23,5	17,4
60	42,5	34,4	28,4	20,5

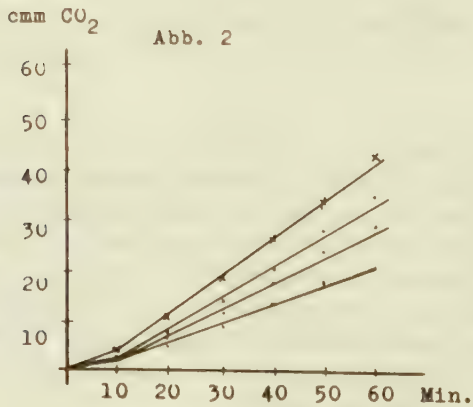


Tabelle 5 und Abbildung 3 zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen von BZ55 auf die Gärung der Hefezelle.

Tab. 5

t _{Min.}	CO ₂ -Produktion in cmm/mg Hefe bei Konzentrationen des BZ55 von:			
	0 % (Leerversuch)	2 %	5 %	10 %
10	12,6	13,3	12,9	10,3
20	23,6	26,9	25,5	21,9
30	42,4	42,7	42,7	35,7
40	56,5	61,7	59,6	51,8
50	72,0	80,3	77,2	69,1
60	86,4	96,3	93,0	79,8

Abb. 3

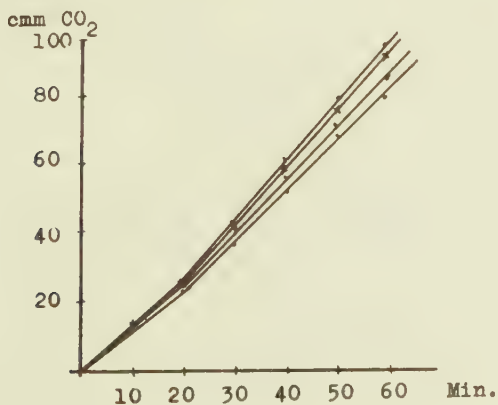


Tabelle 6 und Abbildung 4 zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Phthalylsulfanilylharnstoff auf die Atmung der Hefezelle.

Tab. 6

t _{Min.}	Sauerstoffverbrauch in cmm/mg Hefe bei Konz. des Phthalylsulfanilylharnstoffs von:			
	0% (Leerversuch)	2%	5%	10%
10	4,7	4,4	2,6	2,3
20	15,1	13,8	11,5	7,9
30	25,1	22,6	19,0	14,5
40	34,5	30,9	26,5	20,6
50	44,0	38,0	33,2	25,7
60	50,4	46,3	40,5	32,3

Abb. 4

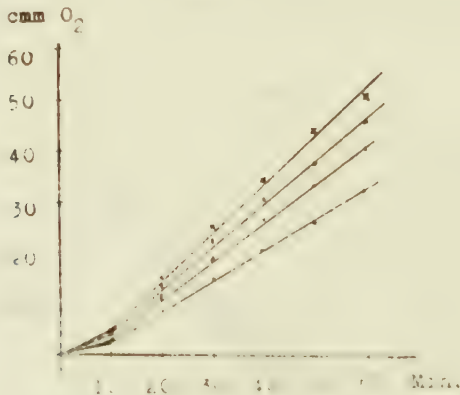


Tabelle 7 und Abbildung 5 zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Phthalylsulfanilylharnstoff auf die Gärung der Hefezelle.

Tab. 7

t _{Min.}	CO ₂ -Produktion in cmm/mg Hefe bei Konz. des Phthalylsulfanilylharnstoffs von:			
	0%	2%	5%	10%
	(Leerversuch)			
10	14,6	13,0	14,3	15,5
20	25,4	25,1	24,6	28,4
30	40,8	39,6	37,8	49,2
40	61,6	57,5	55,4	65,3
50	86,0	74,9	71,4	87,5
60	97,0	90,2	87,0	104,8

Abb. 5

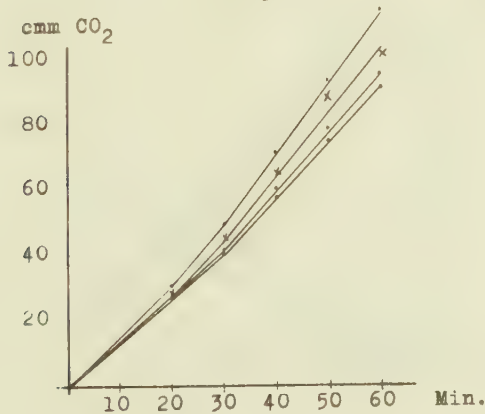


Tabelle 8 und Abbildung 6 zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Propylsulfanilylharnstoff auf die Atmung der Hefezelle.

Tab. 8

t _{Min.}	Sauerstoffverbrauch in cmm/mg Hefe bei Konz. des Propylsulfanilylharnstoffs von:			
	0%	2%	5%	10%
	(Leerversuch)			
10	3,9	3,1	2,6	2,5
20	11,0	10,3	8,0	7,2
30	21,1	19,1	15,8	13,3
40	29,7	25,9	20,3	18,1
50	38,2	32,5	24,6	23,3
60	45,9	38,3	29,2	27,1

Abb. 6

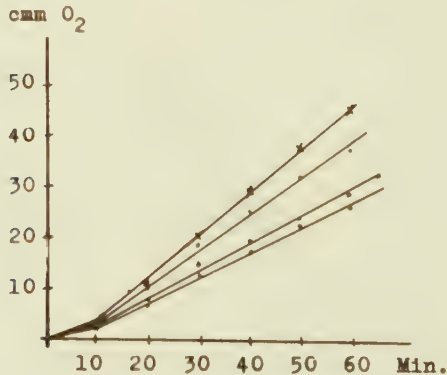


Tabelle 9 und Abbildung 7 zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Propylsulfanilylharnstoff auf die Gärung der Hefezelle.

Tab. 9

t _{Min.}	CO ₂ -Produktion in cmm/mg Hefe bei Konz. des Propylsulfanilylharnstoffs von:			
	0%	2%	5%	10%
	(Leerversuch)			
10	12,6	15,1	14,1	12,0
20	23,6	29,8	28,5	22,6
30	42,5	48,5	48,2	41,6
40	57,6	69,0	65,3	56,9
50	77,5	88,2	85,7	73,9
60	98,0	107,0	101,0	94,0

Abb. 7

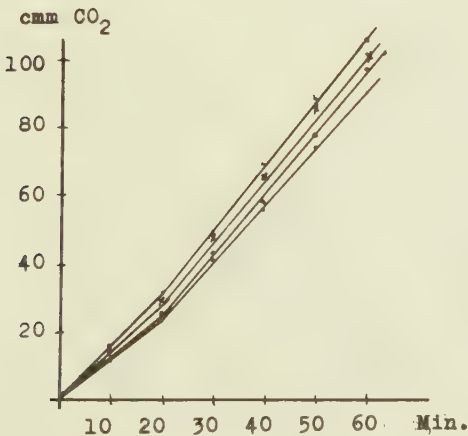


Tabelle 10 und Abbildung 8 zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen von D 860 auf die Atmung der Hefezelle.

Tab. 10

t _{Min.}	Sauerstoffverbrauch in cmm/mg Hefe bei Konzentrationen des D 860 von:			
	0%	2%	5%	10%
	(Leerversuch)			
10	5,0	4,7	2,2	2,2
20	12,6	11,0	5,5	5,0
30	20,6	15,2	10,0	8,7
40	28,6	20,0	15,1	12,4
50	35,4	28,2	20,4	15,0
60	43,2	34,1	24,3	19,9

Abb. 8

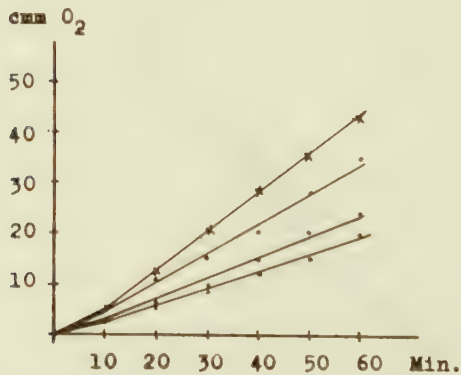
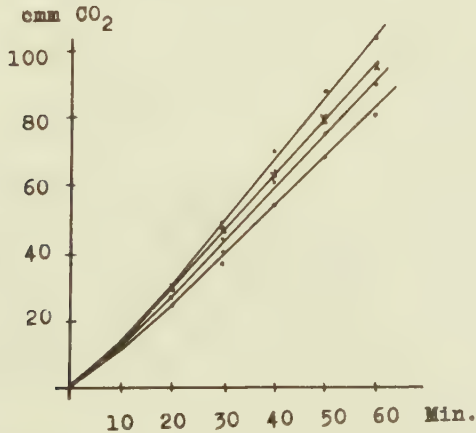


Tabelle 11 und Abbildung 9 zeigen den Einfluss verschiedener Konzentrationen von D 860 auf die Gärung der Hefezelle.

Tab. 11

t _{Min.}	CO ₂ -Produktion in cmm/mg Hefe bei Konzentrationen des D 860 von:			
	0%	2%	5%	10%
	(Leerversuch)			
10	11,0	13,3	12,3	11,7
20	29,1	29,8	25,0	23,8
30	44,0	46,7	40,0	36,1
40	62,6	70,2	60,5	54,1
50	79,5	88,4	75,7	68,6
60	95,9	103,4	90,0	78,2

Abb. 9



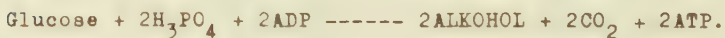
II. Das Verhalten des Phosphatstoffwechsels von Hefezellsuspensionen.

Wie man heute weiss, nimmt die Phosphorsäure im Energiehaushalt der Zelle eine zentrale Stellung ein. Die chemische Energie von Atmung und Gärung wird letzten Endes dazu verwandt, anorganisches Phosphat in "energiereiche" Bindung des Adenosintriphosphats (ATP) überzuführen. In dieser Form wird sie von der Zelle verwertet und zur Deckung des Bedarfs ihrer Lebensäusserungen wie Wachstum, Synthesen, Arbeitsleistungen etc. herangezogen. Über mehr oder weniger komplizierte Zwischenreaktionen werden dabei Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat zurückgebildet.

Legt man für den KH-Abbau die Bilanzgleichungen von Johnson, Lynen u.a. zugrunde, so ergibt sich für den aeroben Abbau:



Und für die Gärung:



Man erkennt, dass bei der Oxybiose, dem eigentlichen energieliefenden Prozess, pro umgesetztes Zuckermolekül wesentlich mehr Phosphorsäure verbraucht wird, als bei der Gärung. Es ist also bei einer Beeinflussung der Atmung eine Auswirkung auf die Phosphorylierungsvorgänge zu erwarten.

Im folgenden Teil soll daher das Verhalten des anorganischen Phosphats bei Gegenwart von blutzuckersenkenden Substanzen untersucht werden.

2. Methodik.

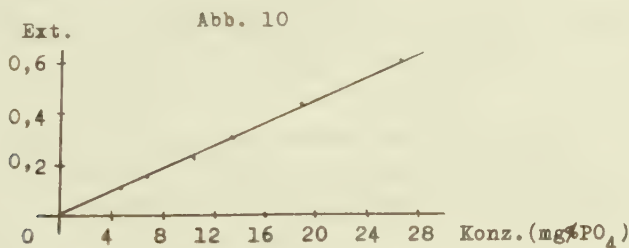
Bestimmt wird das anorganische Phosphat, d.h. die Phosphorsäure, die bei der Behandlung der Hefezellen mit Trichloressigsäure in Lösung geht.

Die dem laufenden Versuch entnommenen Proben werden zu diesem Zweck mit kalter 20%iger Trichloressigsäure versetzt. Die Menge wird so gewählt, dass die Endkonzentration 8% beträgt. Die Zelltrümmer werden nach gründlichem Durchschütteln abzentrifugiert und ein aliquoter Teil der überstehenden Lösung zu den Bestimmungen verwendet.

Die Bestimmungen erfolgen kolorimetrisch nach der von Lohmann und Jendrassik angegebenen und nach Müller variierten Methode (24).

Müller verwendet an Stelle des Eikonogen (1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure) Amidol (2,4-Diaminophenolchlorhydrat) zur Reduktion der Phosphormolybdänsäure.

Abbildung 10 zeigt die Eichkurve mit Amidol.



Da das Beersche Gesetz genau gilt, ist die Extinktion direkt proportional der Konzentration.

Die Konzentration der Phosphorsäure errechnet sich dann aus:

$$\text{Konz.} = \text{Extink.} \times \text{Konstante}$$

Die Konstante ergibt sich aus der Eichkurve.

Reagentien:

- 1) 2,5 %iges Ammoniummolybdat in 5n Schwefelsäure.
- 2) Amidol 0,5 g in 195 ml 15 %igem NaHSO₃ + 5 ml 20 %igem Na₂SO₃.

Ausführung:

2 ml des Zentrifugats werden in einem 25 ml Messkölbchen mit 5 ml Ammoniummolybdatlösung und 1 ml Amidol versetzt. Man füllt dann bis zur Marke mit Aqua dest. auf und bringt dann die Kolben 7 Min. in ein Wasserbad von 37°C , darauf ebensolang in einem von Zimmertemperatur. Mit Filter 72 S wird gegen den Leerwert am Photometer (ELKO) die Extinktion abgelesen.

Die Experimente werden in Erlenmeyerkolben bei Zimmertemperatur durchgeführt. Bei den aeroben Versuchen wird Luft, bei den anaeroben Stickstoff in kontinuierlichem Strom für die Dauer des Versuches durch das Reaktionsgemisch geblasen.

Versuchsansätze:

Die Hefezellen werden in einem Citratpuffer folgender Zusammensetzung suspendiert:

Lösung A: 21,008 g Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
mit 200 ml n-NaOH auf einen Liter.

Lösung B: 0,1 n-NaOH (0,4 g auf 1 Liter)

765 ml Lösung A + 235 ml Lösung B = pH 5,4

30 ml Hefezellsuspension (in Puffer gelöst) werden bei Versuchsbeginn mit 10 ml blutzuckersenkender Substanz und 10 ml Glukose versetzt.

Die Versuchskonzentrationen werden jeweils so gewählt, dass die Endkonzentration der Hefezellsuspension 5%, der Glukose 4% und der blutzuckersenkenden Substanzen 5% beträgt.

Bei den Kontrollversuchen wird statt der 10 ml blutzuckersenkender Substanz die gleiche Menge Puffer zugesetzt.

Alle Phosphatwerte werden in mg angegeben und auf 1 g Frischhefe bezogen.

Im Folgenden werden nur die Versuche mit BZ55 und D860 beschrieben, da die übrigen blutzuckersenkenden Substanzen

prinzipiell das gleiche Verhalten zeigten.

Die in den Tabellen angeführten Grössen repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 3 Parallelversuchen.

Bei der Prüfung des Verhaltens des anorganischen Phosphats während der Atmung und Gärung der Hefezelle muss sich nach Lynen das Augenmerk vor allem auf die ersten Minuten des Versuches nach Zugabe des Zuckers konzentrieren, weil man nur in dieser Zeit Auskunft über das Phosphorylierungsvermögen von Atmung und Gärung erwarten kann (25). Später wird durch die rückläufige Reaktion der Dephosphorylierung, die in Zusammenhang mit der Anhäufung phosphorylierter Abbauprodukte mit stetig zunehmender Geschwindigkeit einsetzt, das Bild verwischt, bis schliesslich ein stationärer Zustand, dem dynamischen Gleichgewicht entsprechend, Phosphorylierung und Dephosphorylierung einander die Waage halten.

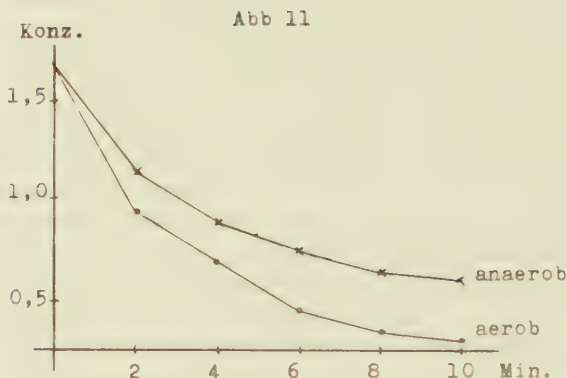
3. ERGEBNISSE.

A. Verhalten des anorganischen Phosphats von Hefezellsuspensionen während der Atmung und Gärung.

Tabelle 12 und Abbildung 11 zeigen zunächst das Verhalten des anorganischen Phosphats während der Atmung und Gärung in den ersten Minuten und ohne Gegenwart von blutzuckersenkenden Substanzen.

Tab. 12

Min.	mg PO ₄ / g Hefe (feucht)	
	aerob	anaerob
0	1,69	1,67
2	0,94	1,13
4	0,69	0,89
6	0,45	0,75
8	0,33	0,64
10	0,31	0,60



Wie die Kurven zeigen, ist unter Sauerstoff die Phosphatbindung gegenüber den anaeroben Versuchen wesentlich gesteigert. Lynen und Holzer (26) konnten nachweisen, dass die schnellere Phosphatbindung unter aeroben Verhältnissen durch die kräftige, mit der Wasserstoff-bzw. Elektronenübertragung über die Fermentkette der Atmung gekoppelten Phosphorylierung bedingt ist.

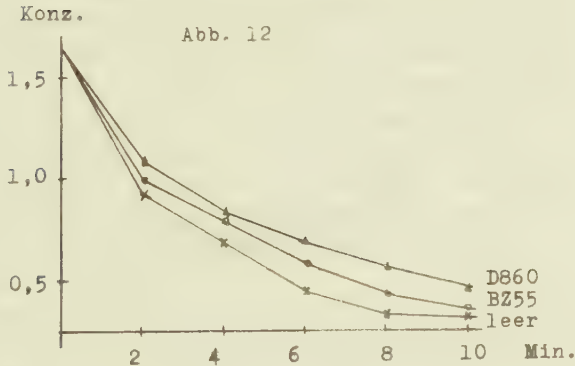
Die im anaeroben Versuch vorhandene geringere Phosphatbindung hat ihren Grund in der Tatsache, dass lediglich bei der Dehydrierung des aus Zucker gebildeten Glyzerinaldehyds Phosphat verbraucht wird.

B. Verhalten des anorganischen Phosphats während der Atmung und
Gärung in Gegenwart blutzuckersenkender Substanzen.

Tabelle 13 und Abbildung 12 geben die aeroben Versuche mit BZ55 und D860 wieder.

Tab. 13

Phosphatwerte in mg PO_4 /g Hefe			
Min.	BZ55	D860	Leervers.
0	1,65	1,67	1,69
2	1,02	1,10	0,94
4	0,80	0,85	0,69
6	0,59	0,70	0,45
8	0,42	0,58	0,33
10	0,35	0,45	0,31

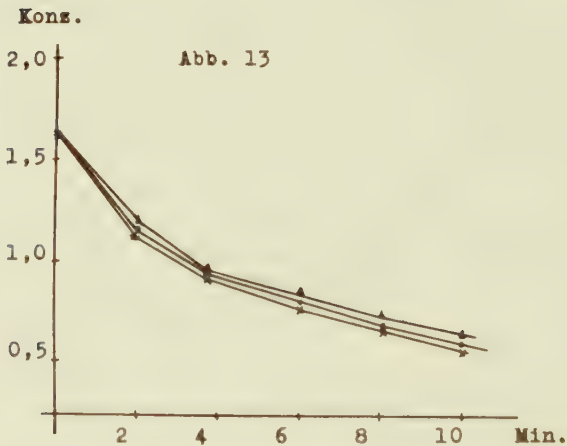


Bei der Betrachtung der Kurven fällt eine deutliche Verlangsamung der Phosphorylierung bei BZ55 und D860 auf. Wie ein Vergleich mit den folgenden Tabellen und Kurven zeigt, nähern sich die Phosphorylierungswerte unter BZ55 und D860 den Grössen, wie sie bei der Gärung beobachtet werden.

Tabelle 14 und Abbildung 13 geben die Gärungsversuche mit BZ55 und D860 wieder:

Tab. 14

Phosphatwerte in mg PO_4 /g Hefe			
Min.	BZ55	D860	Leervers.
0	1,71	1,68	1,70
2	1,15	1,21	1,13
4	0,99	0,99	0,89
6	0,82	0,88	0,75
8	0,64	0,74	0,64
10	0,60	0,65	0,55



Zusammenfassend ergibt sich:

1. Blutzuckersenkende Substanzen hemmen in Abhängigkeit ihrer Konzentration und ihrer chemischen Struktur die Sauerstoffatmung von Hefezellsuspensionen.

2. Blutzuckersenkende Substanzen beeinflussen bis zu Konzentrationen von 10% kaum die Gärung von Hefezellsuspensionen.
3. Blutzuckersenkende Substanzen bremsen unter aeroben Verhältnissen die Aufnahme anorganischen Phosphats.
4. Blutzuckersenkende Substanzen beeinflussen in 5%iger Konzentration kaum den Phosphatstoffwechsel einer Hefezellsuspension während der Gärung.

III. DISKUSSION.

Der Kohlehydratabbau ist gekennzeichnet durch einen stufenweisen, zunächst anaeroben Zerfall der 6 C Kette des Hexosemoleküls in zwei Triosemoleküle mit je drei C Atomen. Die durch entsprechende Umlagerung entstehende Brenztraubensäure wird bei der Glykolyse höherer Organismen direkt zu Milchsäure reduziert, während bei der alkoholischen Gärung der Hefezelle die BTS durch die Carboxylase decarboxyliert und der entstehende Azetaldehyd sofort zu Äthylalkohol reduziert wird. Steht Sauerstoff zur Verfügung, dann schließt sich an den anaeroben Abbau die Oxydation der BTS über den Zitronensäurezyklus an, wobei letztlich Kohlensäure und Wasser entstehen.

Dieser Abbau der KH ist nur in Anwesenheit der Phosphorsäure möglich. Durch die Überführung von anorganischem Phosphat in die energiereiche Bindung der Adenosintri-phosphorsäure wird eine ökonomische Ausnützung der energieliefernden Vorgänge von Oxydation, Glykolyse und Gärung möglich. Vor allem entsteht bei der vollständigen Verbrennung der Glykose im Zitronensäurezyklus energiereiches Phosphat. Jede Beeinträchtigung der Atmung hat daher zwangsläufig einen ver-

minderten Umsatz von anorganischem in organisches Phosphat zur Folge, wie umgekehrt bei verminderter Phosphorylierung auf eine Hemmung der oxydativen Prozesse geschlossen werden kann. Beide Effekte aber, sowohl eine Hemmung der Atmung, als auch ein vermindertes Phosphorylierungsvermögen werden bei den aeroben Versuchareihen beobachtet.

Daraus folgt, dass blutzuckersenkende Präparate das Geschehen des Zitronensäurezyklusses und die nachfolgende Atmungskette der Hefezellen in einen Zustand verminderter Aktivität versetzen; denn wie die anaeroben Versuche erweisen, wird das Gärvermögen der Hefezelle kaum beeinflusst.

Ohne nun eine direkte Parallelität zwischen den Vorgängen der einfachen Hefezelle und denen des hochdifferenzier-ten tierischen bzw. menschlichen Organismus vorauszusetzen, zeigt die Arbeit doch, dass die Sulfonamide der Sulfanilylharnstoffreihe, wie N-Butyl-n-Sulfanilylharnstoff (BZ55), aber auch der Toluolabkömmling N-(Methylbenzolsulfonyl)-n-Butylharnstoff (D860) direkt in den fermentativen Abbau der KH eingreifen können. Allerdings reichen diese experimentellen Ergebnisse allein nicht aus, um in dem System des oxydativen KH-Abbaus den genauen Angriffsort der Substanzen in der Fermentkette festlegen zu können; denn legt man der Diskussion eine Beeinflussung der Fermentaktivitäten zugrunde und geht man von der Vorstellung aus, dass alle Umsetzungen - und damit die Energiegewinnung in der Zelle - an die regelrechte Abfolge einer Kette von Fermentaktivitäten gebunden sind, die in bestimmten Relationen zueinander stehen, dann wird verständlich, dass die Hemmung irgendeiner in der Hauptkette liegenden Reaktion das ganze System lahmlegt (27).

Die blutzuckersenkenden Substanzen scheinen eine optimale Wirkung zu entfalten, wenn der Substituend am Sulfanilylharnstoff aus einer aliphatischen Gruppe mit einer Kettenlänge von 4 C-Atomen besteht.

Auffallend ist weiterhin, dass das CO-A Enzym eine der Struktur der blutzuckersenkenden Präparate ähnliche Grup-

pierung enthält. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass - analog der Blockierung der Paraaminobenzoessäure bei der bakteriostatischen Wirkung der Sulfonamide - eine Hemmung bzw. Verdrängung des CO-A Enzyms durch die blutzuckersenkenden Substanzen die beobachteten Effekte bewirkt.

Es erscheint daher wünschenswert, in weiteren Versuchen zu klären, ob die Schädigung der Atmung tatsächlich eine Schädigung des wesentlichen transferierenden Fermentes, nämlich des CO-A Enzyms darstellt.

IV. Literaturverzeichnis

Dixon M.: "Manometric Methods" Cambridge 1951.

Warburg O.: "Über den Stoffwechsel der Tumoren" Berlin 1926.

Edlbacher S., Leutnart F.: "Lehrbuch der physiologischen Chemie"
Berlin 1954.

Hosemann H.: "Die Grundlagen der statistischen Methoden"
Stuttgart 1949.

Hoppe-Seyler, Thierfelder: "Handbuch der physiologisch - und
pathologisch - chemischen Analyse"
Berlin 1924.

- (1) Janbon M., Chaptal J., Vedel A., Schaap J.: Montpellier méd.
21-22 (1942) S. 441.
- (2) Janbon M., Lacerges P., Metropolitanski J.H.: Montpellier
méd. 21-22 (1942) S. 489.
- (3) Loubatières A., Goldstein L., Metropolitanski J.H., Schaap J.:
Comm. XLIII^e Congr. Médic. aliénistes et neurologistes de
France de pays de Langue française, Montpellier 28-30, Okt. 1942
- (4) La Barre J., Reusse I.: Arch. néerl. physiolog. 28 (1947) S. 475.
- (5) Loubatières A.: Thèse Doct. Sci. naturelles, Montpellier 1946
- (6) v. Holt C., v. Holt L., Kröner B., Kühnau J.: Naturwissenschaften
41 (1954) S. 166.
- (7) v. Holt C., Ferner H.: Zschr. Zellforsch. 42 (1952) S. 305.
- (8) Creutzfeld W., Tecklenborg E.: Klin. Wschr. 33 (1955) S. 43.
- (9) Creutzfeld W., Tecklenborg E.: Arch. exper. Pharmak., Leipzig
227 (1955) S. 23.
- (10) Franke H., Fuchs J.: Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) S. 331.
- (11) Bertram F., Bendfeldt E., Otto H.: Dtsch. med. Wschr. 80 (1955)
S. 1455.
- (12) Vonkennel J., Kimmig J.: Klin. Wschr. 20 (1941) S. 2.
- (13) Loubatières A.: Compt. rend. Soc. biol., Montpellier (1946)
- (14) Zit. nach: Constam G.R., Bonhôte D. u. a.: Schweiz. med. Wschr.
86, 24 (1956) S. 6 (Sonderdruck)

- (15) Pfeiffer E.F., Schöffling K., Steigerwald H.: Dtsch.med.Wschr. 81 (1956) S. 840.
- (16) Ferner H., Runge: Dtsch.med.Wschr. 81 (1956) S. 333.
- (17) Bertram F., Bendfeldt E., Otto H.: Dtsch.med.Wschr. 80,40 (1956) S. 1455.
- (18) Kracht J., Rausch-Stroomann J.G.: Naturwissenschaften 43 8 (1956) S. 180.
- (19) Creutzfeld W., Finter H.: Dtsch.med.Wschr. 81,22 (1956 S. 892
- (20) Achelis J.H.: Germ.med.J. (1956) S. 30.
- (21) Maske H.: Dtsch.med.Wschr. 81,22 (1956) S. 899.
- (22) Zit.nach: Constan G.R., Bonhôte D. u.a.: Schweiz.med.Wschr. 86,24 (1956 S. 11 (Sonderdruck)
- (23) Dixon M.: "Manometric Methods", Cambridge 1951, S. 11-14.
- (24) Müller: Zschr.physiolog.Chemie 35 (1935) S. 237.
- (25) Lynen F.: Liebigs Ann. 573 (1951) S. 66.
- (26) Lynen F., Holzer H.: Liebigs Ann. 563 (1949) S. 213.
- (27) Holzer H.: "Über Fermentketten", 4.Coll.d.G.f.phys.Chemie April 1953.

Lebenslauf:

Am 14. Febr. 1931 wurde ich als erster Sohn der Heizerseheleute Michael und Franziska Schmidt, geb. Schwarz, zu Nürnberg geboren.

Ab Ostern 1937 Besuch der Volksschule.

Im September 1941 Übertritt an das Realgymnasium Nürnberg.

Von 1943-45 wegen Evakuierung Besuch der Oberschule Schwandorf.

Von 1946 bis zum Abitur 1951 wieder am Realgymnasium Nürnberg.

Bis zur Immatrikulation für das Medizinstudium an der Universität Erlangen im November 1952 war ich in der Industrie tätig.

Im Februar 1955 unterzog ich mich der Ärztlichen Vorprüfung und im Sommersemester 1958 bestand ich das Ärztliche Staatsexamen an der Universität Erlangen, die ich während meines Medizinstudiums nie gewechselt habe.

Theodor Schmidt.

Es ist mir ein Bedürfnis an dieser Stelle Herrn Medizinal-
direktor Prof. Dr. med. D. Jahn für die freundliche Über-
lassung des Themas und des Referates ergebenst zu danken.

Theodor Hans Schmidt.

